

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO DO EXTRATO BRUTO LIOFILIZADO  
DE *Mandevilla velutina* EM CAMUNDONGOS  
INOCULADOS COM *Toxoplasma gondii* OU  
CÉLULAS PROLIFERATIVAS DO SARCOMA 180

FRANCISLENE GLÓRIA DE FREITAS

Monografia apresentada à  
Coordenação de Curso de Ciências  
Biológicas para obtenção do grau em  
bacharel.

Uberlândia - MG  
Julho - 1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito do Extrato Bruto Liofilizado de *Mandevilla velutina*  
em Camundongos Inoculados com *Toxoplasma gondii* ou  
Células Proliferativas do Sarcoma 180

FRANCISLENE GLÓRIA DE FREITAS

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 09/07/99 NOTA 100,00

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi  
Orientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Inês Brandeburgo

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Benvinda Rosalina dos Santos

*Ana Maria Coelho*  
Universidade Federal de Uberlândia  
Centro de Ciências Biomédicas  
Prof.<sup>a</sup> Ana Maria Coelho Carvalho  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, 09 de julho de 1999.

*Dedico o presente trabalho à  
meus pais, Edson e Lúzia, pelo  
incentivo, confiança e respeito à  
mim dedicados em todos os  
momentos de minha vida.*

*Ofereço ao meu irmão Pablo, às  
minhas avós Iracema e Maria  
Lúcia, aos meus avós Linval e José  
Laurentino e ao meu namorado  
Marcelo, pelo carinho e dedicação.*

*Aos meus grandes amigos,  
Carolina, Evandro, Roseli e Rogério  
principalmente e, à Deus pela  
existência da vida ...*



## RESUMO

Efeito do Extrato Bruto Liofilizado de *Mandevilla velutina* em camundongos Inoculados com *Toxoplasma gondii* ou Células Proliferativas do Sarcoma 180.

Na medicina popular, o extrato de *M. velutina* vem sendo utilizado no tratamento de acidentes ofídicos e da Doença de Chagas, além de outros empregos. O objetivo deste trabalho foi testar este extrato em camundongos inoculados com *Toxoplasma gondii*, assim como, em células proliferativas do Sarcoma 180. O rizoma foi pesado, lavado em água destilada, imerso em solução de etanol 70%, novamente lavado, ralado e macerado em álcool de cereais 15%, durante 7 dias à temperatura ambiente. O extrato obtido foi liofilizado e ressuspendido em água filtrada. Utilizou-se camundongos Swiss (machos, 35-38g, 5 semanas) mantidos em condições de ração e água *ad libitum* e temperatura ambiente, os quais foram separados em grupos com 05 animais em cada. Este estudo consistiu na administração do extrato nas doses de 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal pelas vias intraperitoneal ou orogástrica, no caso de camundongos infectados com *T. gondii*. Para as células proliferativas do Sarcoma 180, as doses de E.B.L. utilizadas para a homogeneização, durante uma hora, foram de 10, 20 e 30 mg/ml de inóculo e, posteriormente inoculadas em camundongos normais. Os resultados referentes ao tempo de sobrevivência nos ensaios com *T. gondii* e, o ganho de peso, mortalidade e exsudato peritoneal coletado, para ensaios com Sarcoma 180, não apresentaram diferença significativa entre os animais tratados e o grupo controle. Portanto, não se pôde atribuir a atuação do extrato de *Mandevilla velutina* ao aumento de sobrevivência dos animais inoculados com *Toxoplasma gondii* ou com células proliferativas do Sarcoma 180.

## Agradecimentos

Primeiramente, agradeço ao Regildo Márcio Gonçalves da Silva, pela sua colaboração imensurável em ceder a planta utilizada por ele em sua monografia, e pela paciência em ensinar-me lições científicas e do cotidiano, as quais me auxiliam à crescer.

Os meus sinceros agradecimentos à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi por sua dedicação, orientação e companheirismo que me iniciaram no caminho científico.

Às minhas co-orientadoras, Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês e Prof. Dr<sup>a</sup>. Benwinda, por me ajudarem a construir e consolidar um extenso conhecimento científico, e à professora Dr<sup>a</sup> Cecília Lomônaco de Paula pelo carinho e auxílio na parte estatística deste trabalho.

A todos os professores, funcionários e alunos do Curso de Ciências Biológicas pelo ajuda e carinho que contribuíram com um pouquinho de sua formação.

Agradeço a todos, os amigos do laboratório, e em particular, aos estagiários, Fábio, Luís Fernando, Gilvan, Fabiana, Willian, Fábio Moroni, Polyana, Renata e Tatyana e aos funcionários, Cleuber e Tiana, pelos conselhos, companheirismo e carinho.

Aos funcionários, estagiários e professores do Laboratório de Imunologia (DEPAT) pela colaboração neste trabalho, em especial, ao Prof. Dr. Mineo por fornecer os agentes biológicos utilizados neste, e aos técnicos, Juninho e Junão, pela paciência e auxílio na padronização das técnicas de repique e quantificação daqueles.

Aos amigos, Alexandre, Ana Paula, Andreia, Fabiane, Francis, Grace, Kátia, Pablo, Selma, Taíssa e Tatyana, que ao meu lado, possibilitaram-me identificar os possíveis caminhos a serem percorridos, permanecendo ao meu lado, após uma escolha decepcionante, aparando-me; ou, bem sucedida, vibrando comigo. A estes, os meus sinceros, imensos e eternos agradecimentos

“Há muitas formas de se perder o tempo e poucas oportunidades de recuperá-lo; lamentável é que com o tempo também se vai a vida”

(Ramsol)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito do Extrato Bruto Liofilizado de *Mandevilla velutina*  
em Camundongos Inoculados com *Toxoplasma gondii* ou  
Células Proliferativas do Sarcoma 180

FRANCISLENE GLÓRIA DE FREITAS

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM \_\_/\_\_/\_\_ NOTA \_\_\_\_

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi  
Orientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Inês Brandeburgo

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Benvinda Rosalina dos Santos

Uberlândia, 09 de julho de 1999.

## SUMÁRIO

I - Introdução .....	01
II - Objetivo .....	05
III - Material e Métodos .....	06
3.1. Animais .....	06
3.2. Extrato Bruto Liofilizado (E.B.L.) de <i>M. velutina</i> .....	06
3.3. Manutenção da cepa RH de <i>T. gondii</i> .....	07
3.4. Manutenção do Sarcoma 180 .....	07
3.5. Quantificações .....	08
3.6. Inoculação dos agentes biológicos .....	09
3.7. Administração do E.B.L. de <i>M. velutina</i> em camundongos infectados com <i>T. gondii</i> .....	09
3.8. Desenvolvimento de camundongos normais .....	12
3.9. Extrato de <i>M. velutina</i> homogeneizado com células proliferativas do Sarcoma 180 .....	12
3.10. Desenvolvimento de camundongos inoculados com quantidades variáveis de células proliferativas do Sarcoma 180 .....	13
3.11. Seguimento evolutivo dos animais .....	13
3.12. Tratamento Estatístico .....	14
IV - Resultados .....	15
4.1. Efeito do E.B.L. de <i>M. velutina</i> na mortalidade de camundongos de camundongos infectados por <i>T. gondii</i> .....	15
4.2. Estudo do desenvolvimento de camundongos normais .....	27
4.3. Efeito do E.B.L. de <i>M. velutina</i> homogeneizado com células proliferativas do Sarcoma 180 .....	28
4.4. Estudo dos desenvolvimento de camundongos inoculados com quantidades variáveis de células proliferativas .....	32
V - Discussão e Conclusão .....	39
VI - Referência Bibliográfica .....	45



## I - INTRODUÇÃO

Em todas as fases do desenvolvimento das civilizações, as plantas medicinais sempre foram utilizadas pelo homem, gerando um acúmulo de informações por meio de experiências de vários povos, representando milênios de história. No entanto, com o advento da síntese química, os alopáticos passaram a substituir paulatinamente as plantas medicinais, por possuírem fármacos com funções fisiológicas semelhantes às plantas e serem sinteticamente produzidos (MING, 1994).

Com o transcurso dos tempos surgiram doenças de interesse mundial, como a AIDS e o câncer, comprometendo um número crescente de vítimas e, as drogas utilizadas por não conseguirem êxito na cura destas moléstias emergentes, além de serem agressivos e de alto custo, contribuíram para o retorno da quimioterapia ao seu ponto de origem - as Plantas Medicinais.

Na Europa, Estados Unidos, China e Índia, o uso de medicamentos de origem vegetal é maior do que os quimiosintéticos e, no Brasil, não se dispõe de dados seguros, entretanto, a tendência de acompanhar o restante do mundo é forte. Como descrito pelo Centro Internacional de Comércio, houve um aumento de 20 milhões de dólares, de 1967 à 1971, nas importações de matéria prima de origem vegetal pela indústria farmacêutica e de cosméticos, revelando um progresso crescente de 7% (*ibid*, 1994). Portanto, seria imperdoável a desvalorização de seu próprio potencial, por ter a região

tropical brasileira uma grande variedade de plantas medicinais, sendo algumas destas exportadas.

O Cerrado (sentido amplo), dentre os biomas brasileiros, possui uma extensa área coberta por um tapete de gramíneas, arbustos e pequenas árvores retorcidas, além de uma beleza inestimável de flores exóticas e plantas medicinais. Destacando-se entre estas, a arnica, catuaba, jurubeba, sucupira, angico, a *Mandevilla velutina* (Jalapa, Batata do Cerrado, do Campo ou Infalível), dentre outras.

Essa última planta é um arbusto com raízes tipo rizoma, parte aérea composta por flores tubulares de coloração rósea e folhas simples e opostas. Distribui-se por todo Planalto Meridional, abrangendo a Bahia, Mato Grosso, Santa Catarina, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, sendo encontrada com maior frequência nestes três últimos Estados (APEZZATO, 1988).

Os componentes do extrato bruto de *Mandevilla velutina* destacam-se por apresentarem ação antiinflamatória contra picada de serpente *Bothrops jararaca* (HENRIQUES *et al.*, 1991) neutralizando o edema em pata traseira de rato inibindo a liberação de ácido aracdônico (CALIXTO *et al.*, 1991), atuando como antagonistas da bradicinina na inflamação causada pela peçonha (CALIXTO *et al.*, 1992) e, antagonizam a ação da fosfolipase A2 e fosfolipase C em edemas de patas de camundongos (NEVES *et al.*, 1993).

Além disso, apresentam certa eficácia no tratamento da Doença de Chagas Experimental por reduzir significativamente a parasitemia e a mortalidade de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* (SILVA, 1996). Popularmente, esta planta é empregada no tratamento de outras parasitoses e em casos de câncer por promover melhoras significativas nos pacientes.

Devido às diversas aplicações populares sem comprovação científica, iniciou-se o estudo da possível atuação do extrato de *M. velutina* em camundongos inoculados com *Toxoplasma gondii* ou células proliferativas do Sarcoma 180.

A toxoplasmose é uma moléstia causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, agente etiológico, que infecta principalmente vertebrados, como animais domésticos e o homem. Está entre os parasitas de infecções crônicas mais prevalentes entre os humanos, infectando de 25% à 50% da população em geral, não discriminando os mais variados climas e condições sociais. A identificação dos fatores da virulência é complicada pois a doença é raramente evidenciada em hospedeiros normais, sendo uma infecção



assintomática (COUTINHO, 1991; KAWAZOE, 1995). É um importante patógeno oportunista devido à reativação dos cistos formados durante a infecção crônica em hospedeiros imunocomprometidos, incluindo os pacientes portadores do vírus HIV (LUFT & REMINGTON, 1993 *apud* GROSS, 1996), os que receberam transplante de órgãos e os tratados com quimioterápicos devido ao câncer (ISRAELSKI & REMINGTON, 1993 *apud* GROSS, 1996).

O homem adquire a infecção por algumas vias: a ingestão de oocistos encontrados nas fezes de gatos não-imunes; ingestão de cistos com bradizoítas e/ ou taquizoítas encontrados em carne crua ou mal cozida, especialmente de suínos e caprinos; por relações sexuais; pela amamentação realizada em estado agudo da infecção; ou por infecção congênita ou pré-natal (COUTINHO, 1992); além da infecção por contato direto com secreções de animais infectados, por transfusão sanguínea e em acidentes de laboratório (CAMARGO, ANTUNES & CHIARI, 1995).

Um modelo experimental esclarecedor para estudo da toxoplasmose são os camundongos, pelo fato destes apresentarem muita sensibilidade à infecção após inoculação intraperitoneal de formas parasitárias e não existir acometimento espontâneo. As infecções peritoniais produzem exsudato rico em formas taquizoítas que se desenvolvem rapidamente, conferindo aos camundongos um tempo de sobrevida bastante curto, de quatro a seis dias, no caso de cepas não cistogênicas e de alta virulência. Ao realizar necrópsia são vistas lesões no fígado, no baço e nos rins (NÓBREGA *apud* NETO *et al.*, 1982).

Já o sarcoma refere-se a um tipo de tumor maligno de origem mesenquimal que possui, em geral, pouquíssimo estroma de tecido conjuntivo apresentando uma morfologia líquida, pelo desenvolvimento livre de células, com vários núcleos de tamanho desigual e citoplasma denso, na cavidade peritoneal (BOGLIOLO, LIMA PEREIRA & GUIMARÃES CARDOSO, 1981).

Os camundongos também representam um ótimo modelo experimental porque simulam com certa eficiência situações patológicas, possibilitando assim a realização de inferências à outros mamíferos, além de apresentar, geralmente, um quadro mais rápido do que seria observado em outros animais e no homem, viabilizando as pesquisas. Nesses animais há grande proliferação intraperitoneal levando ao óbito do 10º ao 15º dia. Já ao ser inoculado intramuscularmente, o sarcoma em questão apresenta



desenvolvimento de formato sólido, com ulceração avermelhada e, intraperitonealmente, desenvolve-se na forma líquida já citada, levando à distensão abdominal (ARAÚJO, 1995).

Portanto, o estudo das utilidades do extrato bruto de *Mandevilla velutina* e seus componentes em relação ao tratamento de moléstias, como toxoplasmose e um dos tipos de câncer experimental causado por células proliferativas do Sarcoma 180, que possui mecanismos biológicos semelhantes aos cânceres de interesse humano, é de grande importância para o avanço da farmacologia, por poder contribuir para a descoberta de novas drogas, melhorando a qualidade de vida dos portadores.

## II - OBJETIVO

O presente trabalho teve por objetivo estudar o efeito do extrato bruto liofilizado de *Mandevilla velutina* em camundongos inoculados com *Toxoplasma gondii* ou com células proliferativas do Sarcoma 180.

## III - MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Animais

Utilizou-se camundongos da raça Swiss, com aproximadamente 5 semanas de idade e peso médio de 35 g, fornecidos pelos Biotérios das empresas Vallée Nordeste e Pentapharma. Os animais foram mantidos no Laboratório de Bioquímica do DEGEB-UFU, em condições de ração e água filtrada *ad libitum* e temperatura ambiente.

### 3.2. Extrato Bruto Liofilizado de *Mandevilla velutina* (SILVA, 1996)

#### 3.2.1. Preparação do Extrato Alcoólico Bruto (E.A.B.) de *M. velutina*.

O rizoma de *M. velutina*, coletado na região de cerrado em Uberlândia, foi pesado, lavado em água destilada por 20 minutos, imerso durante 2 horas em uma solução de etanol 70% e novamente, lavado. Em seguida, ralado e os seus fragmentos foram macerados, durante sete dias, à temperatura ambiente, em frasco âmbar, em álcool de cereais a 15%; sendo que, utilizou-se a seguinte proporção: 1 litro de solução para cada 100 g de



rizoma. Após este período, o extrato foi separado dos fragmentos do rizoma e armazenado à - 20°C.

### **3.2.2. Preparação do Extrato Bruto Liofilizado (E.B.L.) de *Mandevilla velutina***

O extrato alcoólico bruto obtido, conforme descrito no item 3.2.1, foi separado em frascos e liofilizado. Os materiais liofilizados foram pesados, ressuspensos em água destilada e armazenamento à - 20°C.

### **3.3. Manutenção da cepa RH de *Toxoplasma gondii***

Utilizou-se a cepa RH de *Toxoplasma gondii*, isolada por Sabin, em 1941, do cérebro de criança falecida aos seis anos, que possui uma alta virulência e patogenicidade (NETO *et al.*, 1982). A cepa fornecida pelo Laboratório de Imunologia (DEPAT-UFU) foi mantida por passagens sucessivas em camundongos, em intervalos regulares de 48 horas, no Laboratório de Bioquímica (DEGEB-UFU).

Os procedimentos foram os seguintes: sacrificar o animal infectado e após, colocá-lo em decúbito dorsal; em seguida, inocular via intraperitoneal 5,0 ml de solução de NaCl 0,85% (autoclavada a 150°C por 15 minutos), para lavar a cavidade e conseguir as formas taquizoíticas para preparo das lâminas. Realizou-se a análise qualitativa obtendo, assim, melhores formas parasitárias e uma baixa taxa de contaminantes (presença de microorganismos indesejáveis). Em seguida, inoculou-se intraperitonealmente 0,2 ml do lavado peritoneal por animal.

### **3.4. Manutenção do Sarcoma 180**

Foram utilizadas células proliferativas do Sarcoma 180 fornecidos pelo Laboratório de Imunologia (DEPAT-UFU), sendo mantidas por repique em camundongos no Laboratório de Bioquímica (DEGEB-UFU), em intervalos de dez dias.

Após sacrificar o animal contaminado, o líquido ascítico foi retirado com o auxílio de uma seringa e, deste separou-se 10 µl para a montagem da

lâmina, objetivando apenas a análise qualitativa das células proliferativas, seguida da inoculação de 0,3 ml em cada camundongo.

### 3.5. Quantificações

#### 3.5.1. Cepa RH de *Toxoplasma gondii*

A quantificação consiste em retirar a solução do animal infectado, conforme descrito no item 3.3., seguindo os procedimentos descritos por WILSON, TSAI & REMINGTON, (1980): centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, e em seguida, ressuspender o precipitado em 5 ml de PBS (Tampão fosfato 0,01M com salina, pH=7,2) e centrifugar novamente nas mesmas condições. Desta solução final separou-se uma alíquota de 50 µl acrescentando o mesmo volume de corante Trypan blue 0,4% e, desta nova solução retirou-se 10 µl dispendo-a em uma câmara de Neubauer para efetuar a contagem (análise quantitativa e qualitativa: taquizoítas vivos/mortos).

O número encontrado foi multiplicado por um fator de correção da câmara ( $5 \times 10^4$ ) e pelo fator de diluição (2), o valor obtido refere-se à quantidade de taquizoítas por ml.

#### 3.5.2. Sarcoma 180

Após retirar o líquido ascítico conforme descrito no item 3.4., foi preparado uma solução contendo 50 µl deste e 50 µl de corante Trypan blue 0,04%, desta solução final retirou-se 10 µl para ser disposto em uma câmara de Neubauer, visando realizar a quantificação de células proliferativas (Teste de Exclusão: células vivas/mortas). O número médio de células proliferativas encontrado foi multiplicado por um fator de correção da câmara de Neubauer ( $5 \times 10^4$ ) e pelo fator de diluição, neste caso, 2. Quando o líquido retirado do animal continha um grande número dessas, a solução a ser preparada continha, além das quantidades de corante e líquido ascítico já mencionadas, 100 µl de solução de Ringer Halex Istar, passando o fator de diluição a ser 4. Após a quantificação, foi inoculado um volume total de 0,2 ml por animal contendo as células proliferativas (PEREIRA *et al.*, 1986).



### 3.6. Inoculação dos agentes biológicos:

#### 3.6.1. Taquizoítas de *Toxoplasma gondii*

A partir da quantificação mencionada anteriormente, pôde-se preparar o inóculo de acordo com a metodologia utilizada.

Nos experimentos que exigiram inoculação direta do parasito, a solução preparada continha aproximadamente  $2 \times 10^5$  ou  $10^5$  taquizoítas em um volume final de 0,2 ml de inóculo por animal, ou seja, o número de parasitos necessário acrescido de PBS.

#### 3.6.2. Células proliferativas do Sarcoma 180

Nos experimentos que exigiram inoculação direta da célula proliferativa, a solução preparada continha aproximadamente  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $2,3 \times 10^6$  e  $1,3 \times 10^7$  e  $2 \times 10^6$  destas em um volume final de 0,2 ml de inóculo por animal, ou seja, o número de células proliferativas necessário acrescido de solução de Ringer.

Já nos experimentos em que foi necessária a incubação da célula proliferativa com o extrato vegetal, a solução inóculo foi preparada da seguinte maneira: tendo como base o volume total de inóculo por grupo (1ml), este foi preparado em *ependorfs* contendo a dose de extrato vegetal estipulada acrescida de  $2 \times 10^6$  células proliferativas, o qual teve o seu volume completado com solução de Ringer. Com o auxílio do vórtex, o inóculo foi rapidamente homogeneizado, sendo posteriormente, agitado levemente por 1 hora e, em seguida, realizou-se a inoculação.

### 3.7. Administração do E.B.L. de *Mandevilla velutina* em camundongos infectados por *Toxoplasma gondii*.

#### 3.7.1. Intraperitoneal

O E.B.L. de *M. velutina* foi administrado via intraperitoneal em intervalos regulares de 24 horas, em quatro doses, 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal. Sendo o início do tratamento distinto para os grupos: tratamento prévio com duração de três dias antes da infecção (grupo pré-tratado durante três dias) e tratamento após a infecção, prolongando-se até



o óbito dos animais (grupo tratado após infecção). Os dez grupos com cinco animais em cada foram divididos seguindo os seguintes critérios:

\* GA, animais infectados pré-tratados durante 3 dias com E.B.L. de *M. velutina* na dose de 100 mg/kg de animal;

\* GB, animais infectados pré-tratados durante 3 dias com E.B.L. de *M. velutina* na dose de 200 mg/kg de animal;

\* GC, animais infectados pré-tratados durante 3 dias com E.B.L. de *M. velutina* na dose de 400 mg/kg de animal;

\* GD, animais infectados pré-tratados durante 3 dias com E.B.L. de *M. velutina* na dose de 800 mg/kg de animal;

\* GE, animais infectados tratados após infecção com E.B.L. de *M. velutina* na dose de 100 mg/kg de animal;

\* GF, animais infectados tratados após infecção com E.B.L. de *M. velutina* na dose de 200 mg/kg de animal;

\* GG, animais infectados tratados após infecção com E.B.L. de *M. velutina* na dose de 400 mg/kg de animal;

\* GH, animais infectados tratados após infecção com E.B.L. de *M. velutina* na dose de 800 mg/kg de animal;

\* GI, animais infectados que receberam apenas PBS; portanto, sem tratamento fitoterápico (Grupo Controle Positivo);

\* GJ, animais normais que receberam apenas PBS (Grupo Controle Negativo).

As doses do E.B.L. de *M. velutina* foram preparadas em um volume total de 0,2 ml acrescido de PBS, sendo inoculadas via intraperitoneal nos grupos GA à GH, já os grupos GI e GJ receberam apenas 0,2 ml de PBS em intervalos regulares de 24 horas. O inóculo continha em média  $10^5$  taquizoítas, valor obtido por meio dos procedimentos de quantificação mencionados no item 3.5.1.

### 3.7.2. Orogástrica

#### 3.7.2.1. Animais inoculados com $10^5$ taquizoítas/0,2ml de inóculo

O E.B.L. de *M. velutina* foi administrado via orogástrica em intervalos regulares de 24 horas, em quatro doses, 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal. Sendo o início do tratamento distinto para os grupos: tratamento

prévio com duração de três ou sete dias antes da infecção (grupo pré-tratado durante três ou sete dias antes da infecção) e tratado após a infecção, prolongando-se até o óbito dos animais (grupo tratado após infecção).

Os dez grupos foram separados conforme os conforme os critério do item 3.7.1.

As doses do E.B.L. de *M. velutina* foram preparadas em água filtrada. Os animais receberam por meio de uma sonda de polietileno acoplada à agulha de metal 0,5 ml de extrato vegetal (GA à GH) ou de água filtrada (GI e GJ), diretamente até o esôfago, em intervalos regulares de 24 horas. Já o inóculo continha em média de  $10^5$  taquizoítas, número obtido por meio dos procedimentos de quantificação mencionados no item 3.5.1.

### **3.7.2.2. Animais inoculados com $2 \times 10^5$ e $10^5$ taquizoítas/0,2 ml de inóculo**

O E.B.L. de *M. velutina* foi administrado via orogástrica, conforme descrito no item 3.7.2.1., na dose de 214,5 mg/kg de animal por ter sido utilizada por SILVA (1996). Cabe ressaltar que este ensaio foi preliminar aos ensaios descritos anteriormente. A administração do extrato teve início três ou sete dias antes da infecção (grupos pré-tratado durante 3 dias ou 7 dias) ou após a infecção, prolongando-se até o óbito dos animais (grupo tratado após infecção). Sendo tanto a administração do extrato vegetal quanto da água filtrada realizados em intervalos regulares de 24 horas.

Os grupos continham dez animais em cada, sendo separados da seguinte maneira:

\* GA, animais pré-tratados durante 7 dias com  $2 \times 10^5$  parasitos com E.B.L. de *M. velutina*;

\* GA', animais pré-tratados durante 7 dias com  $10^5$  parasitos com E.B.L. de *M. velutina*;

\* GB, animais pré-tratados durante 3 dias com  $2 \times 10^5$  parasitos com E.B.L. de *M. velutina*;

\* GB', animais pré-tratados durante 3 dias com  $10^5$  parasitos com E.B.L. de *M. velutina*;

\* GC, animais tratados após à infecção com  $2 \times 10^5$  parasitos com E.B.L. de *M. velutina*;

\* GC', animais tratados após à infecção com  $10^5$  parasitos com E.B.L. de *M. velutina*;



\* GD, animais infectados com  $2 \times 10^5$  parasitos que receberam somente água filtrada (Grupo Controle);

\* GD', animais infectados com  $10^5$  parasitos que receberam somente água filtrada (Grupo Controle).

### 3.8. Desenvolvimento de camundongos normais

Um grupo contendo cinco camundongos normais, mantidos nas mesmas condições descritas no item 3.1., foi formado para ser acompanhado o desenvolvimento destes, em particular, o peso e a mortalidade. Esses foram marcados com uma solução de Ácido Pírico 0,47% em regiões específicas que os distinguíssem: cabeça (C), cauda (R), dorso (D), duas marcas (2m) e sem marca (S/m).

### 3.9. Extrato de *Mandevilla velutina* homogeneizado com células proliferativas de Sarcoma 180

Após a realização dos procedimentos descritos no item 3.6.2., formou-se quatro grupos distintos, com cinco animais em cada, os quais foram marcados como descrito no item 3.8., sendo que receberam  $2 \times 10^6$  células proliferativas homogeneizadas, durante 1 hora antes da inoculação, na presença ou ausência de E.B.L. de *M. velutina*:

\* GA, animais que receberam células proliferativas homogeneizadas com extrato na dose de 10 mg/ml de inóculo;

\* GB, animais que receberam células proliferativas homogeneizadas com extrato na dose de 20 mg/ml de inóculo;

\* GC, animais que receberam células proliferativas homogeneizadas com extrato na dose de 30 mg/ml de inóculo.

\* GD, animais que receberam células proliferativas homogeneizadas com solução de Ringer (Grupo controle).



### **3.10. Desenvolvimento de camundongos inoculados com quantidades variáveis de células proliferativas do Sarcoma 180**

Foram formados quatro grupos distintos, GA, GB, GC e GD, compostos por cinco animais em cada devidamente marcados como descrito no item 3.8., que receberam as seguintes quantidades de células proliferativas do Sarcoma 180:  $5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $2,3 \times 10^6$  e  $1,3 \times 10^7$ , respectivamente; sendo obtidas conforme descrito no item 3.5.2.

### **3.11. Seguimento evolutivo dos animais**

#### **3.11.1. Infectados com *Toxoplasma gondii***

##### **Mortalidade**

Acompanhou-se a mortalidade dos indivíduos de todos os grupos tratados com extrato de *M. velutina* para se relacionar a mortalidade do grupo controle, sabendo que a inoculação de  $10^5$  taquizoítas em um volume final de 0,2 ml, leva os animais sem tratamento ao óbito entre o sexto e sétimo dia (BLACK, ISRAELSKI & REMINGTON, 1989).

#### **3.11.2. Inoculados com células proliferativas do Sarcoma 180**

##### **Medida do peso corporal**

Segundo PEREIRA, RASO & COELHO (1986) no décimo dia após a inoculação das células proliferativas, os camundongos Swiss, sem qualquer tipo de tratamento, apresentam um aumento em torno de 12 g em seu peso, quando comparado ao anterior à inoculação. Sendo este fator um grande auxílio para a análise dos experimentos, onde se pesou os animais em intervalos regulares de 48 horas, utilizando-se uma balança de precisão.

##### **Níveis de ascite**

Analisou-se os animais conforme o nível de ascite desenvolvido por estes: +, menor diâmetro abdominal; ++, diâmetro abdominal intermediário e +++, maior diâmetro abdominal.

### **Mortalidade**

A mortalidade dos indivíduos de cada grupo foi registrada, tanto dos experimentos com o uso do fitoterápico, como do experimento sem este tratamento.

### **Medida do volume intraperitoneal**

Após acompanhar a evolução do peso e da mortalidade dos animais, durante um determinado período, os sobreviventes foram sacrificados ou os que haviam morrido a poucas horas, foram pesados e o seu líquido peritoneal retirado com o auxílio de uma seringa, o qual foi quantificado em uma proveta. Por meio de tal procedimento obteve-se uma provável relação entre o peso corpóreo e o volume de líquido peritoneal contendo as células proliferativas do Sarcoma 180.

### **3.12. Tratamento Estatístico**

O tratamento estatístico foi realizado com o auxílio da Prof. Dr<sup>a</sup> Cecília Lomônaco de Paula do DEBIO-UFU, sendo utilizado o programa Microsoft Systat 6.0. A partir das variáveis: tempo de sobrevivência, modo de tratamento e quantidade de taquizoítas ou células proliferativas inoculados, aplicou-se estatística paramétrica. O teste utilizado foi o ANOVA e o Tuckey. Já em relação a porcentagem de mortalidade, utilizou-se o teste do Qui-quadrado, estatística não-paramétrica.

## IV - RESULTADOS

### 4.1. Efeito do extrato bruto liofilizado (E.B.L.) de *Mandevilla velutina* na mortalidade de camundongos infectados por *Toxoplasma gondii*.

#### 4.1.1. Administração intraperitoneal (animais inoculados com $10^5$ taquizoítas)

A investigação do efeito do E.B.L. de *Mandevilla velutina*, feita por meio da administração intraperitoneal do mesmo em quatro doses distintas, 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal - conforme descrito no item 3.7.1. - sobre o tempo de sobrevivência dos camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*, mostrou que os grupos que receberam o extrato vegetal e o grupo controle não apresentaram diferença significativa entre si ( $p=0,172$ ; Teste ANOVA) (Tab. 01).

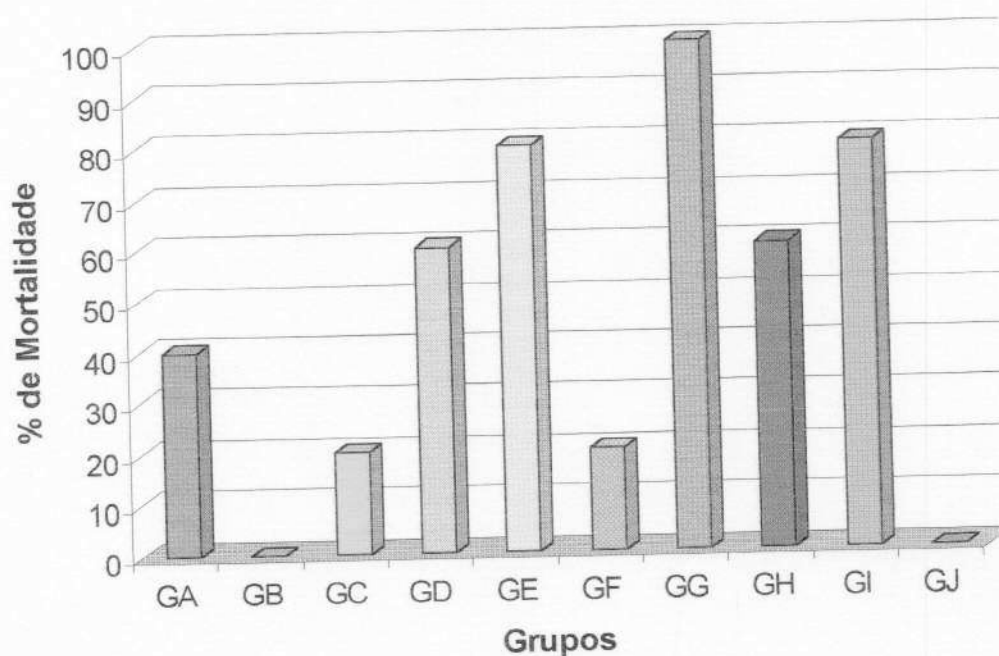
Ao analisar a porcentagem de mortalidade até o quarto dia após infecção, pôde-se encontrar diferença estatística a nível de 0,001 ( $\chi^2=82,20$ ) entre os grupos que receberam o extrato vegetal e o grupo controle. Sendo que, a dose de 200 mg/kg de animal destacou, tanto no pré-tratamento<sup>(1)</sup> como no tratamento<sup>(2)</sup>, por manter a taxa de mortalidade dos grupos GB e GF em 0% e 20%, respectivamente, quando comparado com os grupos GA, GC, GD, GE, GG, GH e GI que apresentaram as respectivas taxas 40%, 20%, 60%, 80%, 100%, 60% e 80% (Tab.01; Fig. 01). Cabe ressaltar



que, o pré-tratamento durante três dias diferiu do tratamento ( $p=0,02$ ; Teste ANOVA), sobressaindo o primeiro ( $X_1 > X_2$ ).

Grupos	Mortalidade (dia após infecção)								
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º
GA	~	~	~	02	03	~	~	~	~
GB	~	~	~	~	04	~	~	01	~
GC	~	~	~	01	02	~	02	~	~
GD	~	~	~	03	02	~	~	~	~
GE	~	~	01	03	01	~	~	~	~
GF	~	~	~	01	02	02	~	~	~
GG	~	~	~	05	~	~	~	~	~
GH	01	01	~	01	01	01	~	~	~
GI	~	~	02	02	~	01	~	~	~
GJ	~	~	~	~	~	~	~	~	~

**Tab. 01.** Efeito do extrato bruto liofilizado (E.B.L.) de *M. velutina* por administração intraperitoneal em intervalos regulares de 24 h no tempo de sobrevivência de camundongos infectados por *T. gondii*: GA, GB, GC e GD – pré-tratados durante 3 dias com o extrato nas respectivas doses: 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal; GE, GF, GG e GH – tratados após a infecção até o óbito com o extrato nas respectivas doses anteriores; GI – (Grupo Controle), animais infectados que receberam v.i. apenas PBS; e GJ - animais normais que receberam v.i. apenas PBS.



**Fig. 01.** Efeito do extrato bruto liofilizado (E.B.L.) de *M. velutina* por administração intraperitoneal em intervalos regulares de 24 h na porcentagem de mortalidade de camundongos infectados com  $10^5$  taquizoítas (*T. gondii*) até o 4º dia após a infecção. GA, GB, GC e GD – pré-tratados durante 3 dias com o extrato nas respectivas doses: 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal; GE, GF, GG e GH – tratados após infecção até o óbito com o extrato nas respectivas doses anteriores; GI – (Grupo Controle), animais infectados que receberam v.i. apenas PBS; e GJ – animais normais que receberam v.i. apenas PBS.

#### 4.1.2. Administração orogástrica

##### 4.1.2.1. Animais inoculados com $10^5$ taquizoítas/0,2ml de inóculo

A investigação do efeito do E.B.L. de *Mandevilla velutina*, feita por meio da administração via orogástrica do mesmo em quatro doses distintas, 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal - conforme descrito no item 3.7.2.1. - sobre o tempo de sobrevivência dos camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*, mostrou que os grupos tratados com o extrato vegetal e o grupo controle apresentam diferença significativa entre si ( $p=0,041$ ; Teste ANOVA) (Tab. 02).

Ao analisar a porcentagem de mortalidade até o quinto e sexto dia após infecção, pode-se encontrar diferença estatística a nível de 0,001 ( $\chi_{5^{\circ}}^2=117,88$ ;  $\chi_{6^{\circ}}^2=39,00$ ) entre os grupos que receberam extrato vegetal e o grupo controle. Sugerindo que a dose de 400 mg/kg de animal, na forma de tratamento após à infecção, proporcionou uma menor taxa de mortalidade até o sexto dia de 40% para o GG, quando comparado com os grupos GA, GB, GC, GD, GE, GF, GH e GI que apresentaram 80%, 80%, 80%, 100%, 80%, 60%, 100% e 100%, respectivamente (Tab.02; Fig. 03).

Cabe ressaltar que os modos de tratamento diferiram ( $p=0,02$ ; Teste ANOVA), tendo o tratamento após infecção<sup>(2)</sup> reduzido a porcentagem de mortalidade significativamente, quando comparado com o pré-tratamento<sup>(1)</sup> ( $X_2 > X_1$ ). No entanto, quando se analisou até o quinto e o sexto dias após infecção pôde-se observar que: até o quinto dia, destacou-se o pré-tratamento com as doses de 200 e 400 mg/kg de animal ao reduzir a taxa percentual de mortalidade em aproximadamente 40% e 60%, respectivamente em relação ao grupo controle; exceção feita a dose de 800mg/kg de animal que proporcionou 80% de mortalidade (Tab.02; Fig.02); e, até o sexto dia, o tratamento após infecção com a dose de 400 mg/kg de animal apresentou uma redução de 60% (Tab.02; Fig. 03).

Já pelo Teste Tuckey, constatou-se também que a dose de 400 mg/kg de animal administrada após infecção (GG) diferiu estatisticamente do grupo pré-tratado com a dose de 800 mg/kg de animal (GD) -  $p=0,015$ , e também, do grupo controle (GI) -  $p=0,047$ .

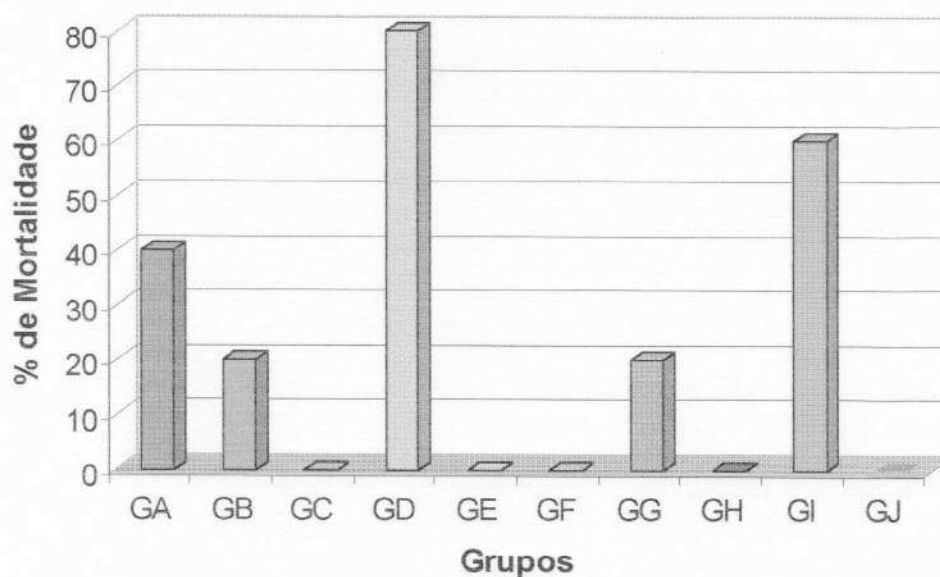
Um indivíduo do grupo tratado (GG) após à infecção sobreviveu por 25 dias até o seu sacrifício, e depois, teve a sua cavidade peritoneal lavada com PBS, para análise ao microscópico e inoculação em cinco animais



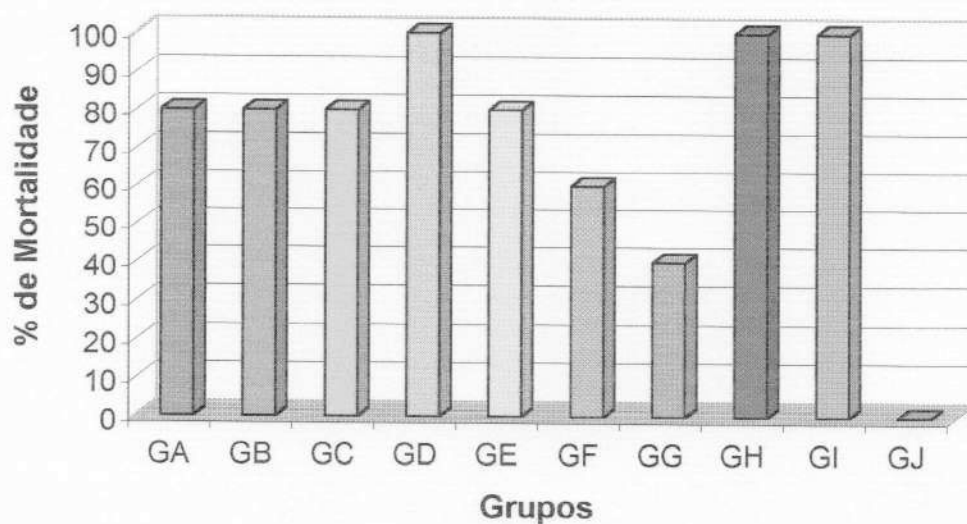
normais, os quais não desenvolveram o processo agudo da toxoplasmose. Na análise, observou-se a existência de taquizoítas no líquido peritoneal retirado que apresentavam a membrana externa lesada constatada pela formação do complexo entre membrana plasmática e corante Trypan Blue.

Grupos	Mortalidade (dia após infecção)								
	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º
GA	-	02	02	01	-	-	-	-	-
GB	-	01	03	-	-	01	-	-	-
GC	-	-	04	01	-	-	-	-	-
GD	01	03	01	-	-	-	-	-	-
GE	-	-	04	-	01	-	-	-	-
GF	-	-	03	01	-	01	-	-	-
GG*	-	01	01	01	-	-	-	01	-
GH	-	-	05	-	-	-	-	-	-
GI	-	03	02	-	-	-	-	-	-
GJ	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tab. 02.** Efeito do extrato bruto liofilizado (E.B.L.) de *M. velutina* por administração orogástrica em intervalos regulares de 24 h no tempo de sobrevivência de camundongos infectados com *T. gondii*. GA, GB, GC e GD – pré-tratados durante 3 dias com o extrato nas respectivas doses: 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal; GE, GF, GG e GH – tratados após a infecção até o óbito com o extrato nas respectivas doses anteriores; GI – (Grupo Controle) animais infectados que receberam apenas água filtrada v.o.; e GJ – animais normais que receberam v.o. apenas água filtrada. \* 01 indivíduo do grupo sobrevivente por 25 dias até sacrifício.



**Fig. 02.** Efeito do extrato bruto liofilizado (E.B.L.) de *M. velutina* por administração orogástrica em intervalos regulares de 24 h na porcentagem de mortalidade de camundongos infectados com  $10^5$  taquizoítas (*T. gondii*) até o 5º dia. GA, GB, GC e GD - pré-tratados durante 3 dias com 0,5ml de inóculo, com extrato de *M. velutina* nas respectivas doses: 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal; GE, GF, GG e GH - tratados após a infecção com extrato de *M. velutina* nas respectivas doses: 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal; GI - (Grupo Controle) animais infectados que receberam somente água filtrada; e GJ - animais normais que receberam somente água filtrada.



**Fig. 03.** Efeito do extrato bruto liofilizado (E.B.L.) de *M. velutina* por administração orogástrica em intervalos regulares de 24 h na porcentagem de mortalidade de camundongos infectados com  $10^5$  taquizoítas (*T. gondii*) até o 6º dia. GA, GB, GC e GD - pré-tratados durante 3 dias com 0,5ml de inóculo, com extrato de *M. velutina* nas respectivas doses: 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal; GE, GF, GG e GH - tratados após a infecção com extrato de *M. velutina* nas respectivas doses: 100, 200, 400 e 800 mg/kg de animal; GI - (Grupo Controle) animais infectados que receberam somente água filtrada; e GJ - animais normais que receberam somente água filtrada.



#### 4.1.2.2. Animais inoculados com $2 \times 10^5$ e $10^5$ taquizoítas/0,2 ml de inóculo

A investigação do efeito do E.B.L. de *Mandevilla velutina*, feita por meio da administração via orogástrica na dose de 214,5 mg/kg de animal, em intervalos regulares de 24 horas, conforme descrito no item 3.7.2.2., possibilitou observar que: os grupos inoculados com  $2 \times 10^5$  taquizoítas apresentaram diferença significativa entre os que receberam extrato vegetal e o grupo controle ( $p=0,045$ ; Teste ANOVA), sendo que o grupo tratado após a infecção (GC) apresentou um aumento no tempo de sobrevivência, quando comparado com o grupo controle (GD) (Tab.3a); enquanto, os grupos inoculados com  $10^5$  taquizoítas não apresentaram diferença estatística entre os grupos ( $p=0,163$ ; Teste ANOVA), ou seja, o tempo de sobrevivência entre todos os grupos, GA', GB', GC' e GD', foi semelhante (Tab.3b).

Além disso, o uso de quantidades variadas de parasitos ( $2 \times 10^5$  e  $10^5$  taquizoítas) possibilitou constatar que, quanto maior a quantidade, menor foi o tempo de sobrevivência dos animais, precisamente no grupo controle - GD (Tab.3a e 3b).

Já ao analisar a porcentagem de mortalidade dos grupos inoculados com  $2 \times 10^5$  taquizoítas até o sexto dia após infecção, encontrou-se diferença estatística a nível de 0,001 ( $\chi_{6}^2=21,06$ ) entre os grupos que receberam extrato vegetal e o grupo controle (GD), sugerindo que o pré-tratamento 3 dias e o tratamento após infecção reduziram a taxa percentual de mortalidade dos grupos GB e GC em torno de 50% (Fig. 04).

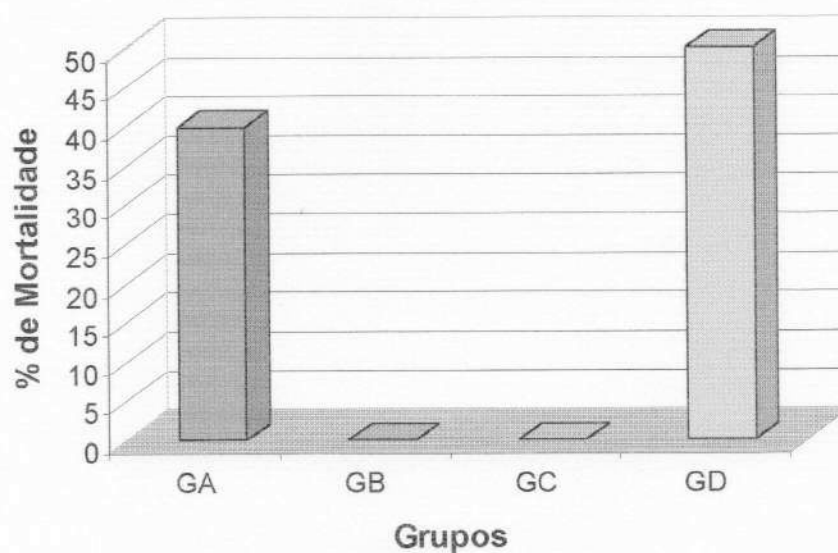
A porcentagem de mortalidade dos grupos inoculados com  $10^5$  taquizoítas até o sétimo dia mostrou diferença significativa a nível de 0,005 ( $\chi_{7}^2=14,60$ ), sendo que os grupos pré-tratados 3 dias (GB') e tratado após infecção (GC') apresentaram uma taxa percentual de 20% e 30%, respectivamente, quando comparado com os grupos pré-tratado 7 dias (GA') e o controle (GD') que apresentaram 80% e 70%, respectivamente (Fig. 06).

Grupos	Mortalidade (dia após infecção)							
	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup>	7 <sup>o</sup>	8 <sup>o</sup>	9 <sup>o</sup>	10 <sup>o</sup>
GA	01	-	02	01	04	-	02	-
GB	-	-	-	-	10	-	-	-
GC	-	-	-	-	07	02	01	-
GD	-	05	-	-	03	02	-	-

**Tab.03a.** Efeito do extrato bruto liofilizado (EBL) de *M. velutina*, por administração de 214,5 mg/kg de animal via orogástrica, em intervalos regulares de 24 h, na mortalidade de camundongos infectados com  $2 \times 10^5$  taquizoítas (*T. gondii*). GA - pré-tratado durante 7 dias; GB- pré-tratado durante 3 dias; GC - tratado após à infecção; e GD - (Grupo Controle) animais infectados que receberam apenas água filtrada.

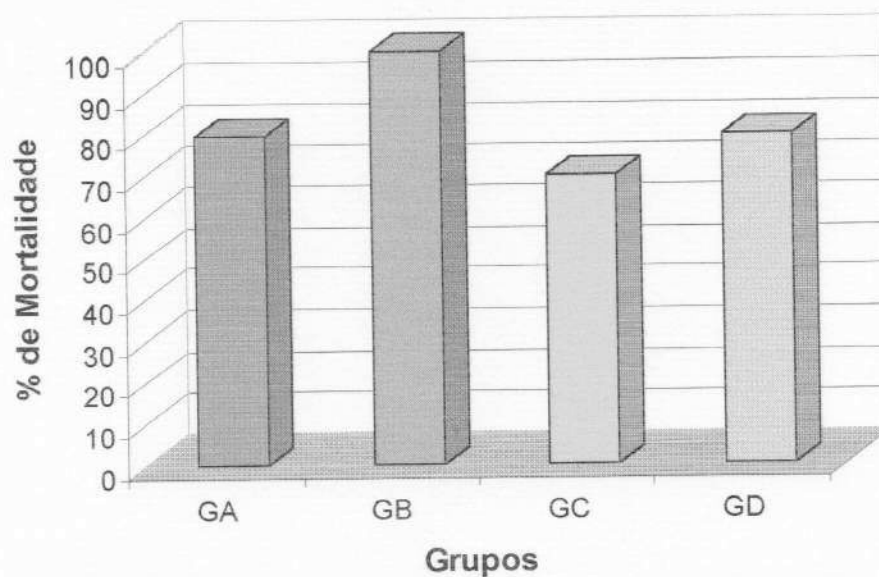
Grupos	Mortalidade (dia após infecção)							
	3 <sup>o</sup>	4 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	6 <sup>o</sup>	7 <sup>o</sup>	8 <sup>o</sup>	9 <sup>o</sup>	10 <sup>o</sup>
GA <sup>7</sup>	-	-	-	-	06	02	02	-
GB <sup>7</sup>	-	-	-	-	02	08	-	-
GC <sup>7</sup>	-	-	-	-	03	05	01	01
GD <sup>7</sup>	-	-	-	-	07	03	-	-

**Tab.03b.** Efeito do extrato bruto liofilizado (EBL) de *M. velutina* administrado na dose de 214,5 mg/kg de animal via orogástrica, em intervalos regulares de 24 h, no tempo de sobrevivência de camundongos infectados com  $10^5$  taquizoítas (*T. gondii*). GA<sup>7</sup> - pré-tratado durante 7 dias; GB<sup>7</sup>- pré-tratado durante 3 dias; GC<sup>7</sup> - tratado após à infecção; e GD<sup>7</sup> - (Grupo Controle) animais infectados que receberam apenas água filtrada.

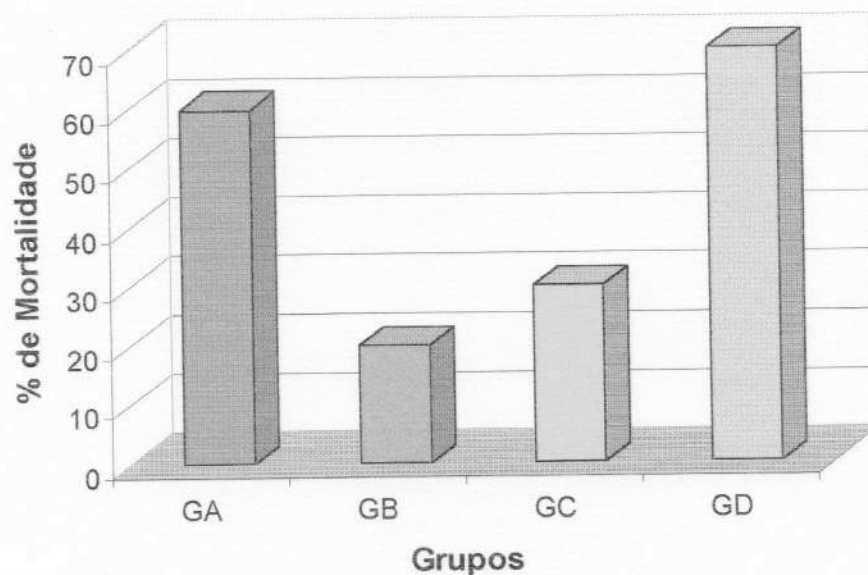


**Fig. 04.** Efeito do extrato bruto liofilizado (E.B.L.) de *M. velutina* administrado na dose de 214,5 mg/kg de animal via orogástrica, em intervalos regulares de 24 h, na porcentagem de mortalidade de camundongos infectados com  $2 \times 10^5$  taquizoítas (*T. gondii*) até o 6º dia. GA - pré-tratado durante 7 dias; GB- pré-tratado durante 3 dias; GC - tratado após a infecção; e GD - (Grupo Controle) animais infectados que receberam apenas água filtrada.





**Fig. 05.** Efeito do extrato bruto liofilizado (E.B.L.) de *M. velutina* administrado na dose de 214,5 mg/kg de animal via orogástrica, em intervalos regulares de 24 h, na porcentagem de mortalidade de camundongos infectados com  $2 \times 10^5$  taquizoítas (*T. gondii*) até o 7º dia. GA' - pré-tratado durante 7 dias; GB' - pré-tratado durante 3 dias; GC' - tratado após à infecção; e GD' - animais infectados que receberam apenas água filtrada (Grupo Controle).



**Fig. 06.** Efeito do extrato bruto liofilizado (E.B.L.) de *M. velutina* administrado na dose de 214,5 mg/kg de animal via orogástrica, em intervalos regulares de 24 h, na porcentagem de mortalidade de camundongos infectados com  $10^5$  taquizoítas (*T. gondii*) até o 7º dia. GA' - pré-tratado durante 7 dias; GB' - pré-tratado durante 3 dias; GC' - tratado após à infecção; e GD' - (Grupo Controle) animais infectados que receberam apenas água filtrada.

#### 4.2. Estudo do desenvolvimento de camundongos normais

Ao analisar o desenvolvimento de camundongos normais, mantidos nas condições descritas no item 3.8., pôde-se observar que 80% destes tiveram um aumento de peso crescente com pouca variação, atingindo 52,5 % em relação ao seu peso inicial ao final de 50 dias, permanecendo vivos ao final de 150 dias de observação. No entanto, um animal que corresponde a 20% apresentou um decréscimo sucessivo em seu peso, indo ao óbito no 45º dia de observação (Tab.04).

Período de Acompanhamento	Peso (g)					Média de Peso	Taxa % de aumento de Peso
	C	R	D	2m	S/m		
1º	23,94	19,84	24,22	25,38	27,85	24,25	
3º	23,89	19,46	24,42	25,47	26,42	23,93	-1,32
6º	23,91	19,63	26,33	25,56	24,69	24,00	-1,03
8º	24,03	19,46	26,84	25,88	23,46	23,93	-1,32
10º	23,89	19,64	27,42	25,79	22,94	23,94	-1,28
12º	24,00	19,49	28,74	26,85	22,53	24,32	0,3
14º	22,90	19,75	30,86	29,02	19,96	24,5	1,04
16º	23,44	20,84	31,89	32,11	19,25	25,50	5,12
19º	23,13	20,48	32,85	33,74	19,48	25,94	6,84
21º	27,76	20,95	34,95	36,54	19,47	27,93	14,51
22º	25,86	19,98	34,19	35,90	18,78	26,94	10,97
45º	28,65	21,63	35,80	38,31	-	31,09	26,37
50º	31,58	27,77	38,08	40,12	-	34,38	41,77

**Tab. 04.** Acompanhamento do desenvolvimento, durante 50 dias, de camundongos normais. Marcações individuais: C – cabeça; R – cauda; D – dorso; 2m – duas marcas; S/m – sem marca; - óbito.



#### **4.3. Efeito do extrato bruto liofilizado (EBL) de *Mandevilla velutina* homogeneizado com células proliferativas do Sarcoma 180**

A investigação do efeito nas doses de 10, 20, 30 mg/ml do E.B.L. de *Mandevilla velutina* sobre  $2 \times 10^6$  células proliferativas do Sarcoma 180, conforme descrito no item 3.9., possibilitou observar que o ganho de peso inicial dos animais, até 34º dia após inoculação, não apresentou diferença significativa entre os grupos ( $p=0,567$ ; Teste ANOVA). No entanto, após este período, constatou-se um aumento no peso do grupo controle (GD) em aproximadamente 110% em relação ao peso inicial deste, quando comparado com a taxa de crescimento médio de 60% dos outros grupos que receberam o extrato vegetal (Tab.05; Fig.07).

Não foi possível observar a variável tempo de sobrevivência pois todos os animais sobreviventes foram sacrificados ao final de 60 dias.

Após este período, o líquido peritoneal de quatro desses animais foi removido e quantificado conforme descrito no item 3.11.2., cujos volumes foram variáveis dentro de um mesmo grupo (8 e 4 ml no GA e, 0,5 e 68 ml, no GD). Os animais sobreviventes do GB e GC não desenvolveram ascite e, portanto, não foi possível a retirada de líquido peritoneal (Tab.06).

Período	Grupo A (trat. 10 mg/ml)				Grupo B (trat. 20 mg/ml)				Grupo C (trat. 30 mg/ml)				Grupo D (controle)						
	C	R	D	S/m	C	R	D	S/m	C	R	D	S/m	C	R	D	S/m			
1º	292	304	293	285	27	283	274	283	27	271	284	272	28	276	25	243	25	241	25
5º	280	326	345	340	295	363	295	326	343	307	300	327	321	312	315	298	28	308	32.5
7º	290	360	349	360	292	382	303	314	353	323	312	344	347	333	313	304	292	311	340
9º	320	380	350	380	300	315	310	326	373	342	319	374	372	356	334	322	309	327	373
12º	338	391	350	400	305	412	301	331	399	345	336	399	381	362	330	353	330	350	382
15º	347	385	356	408	309	434	324	346	416	364	351	411	399	370	342	366	351	375	402
20º	432	419	395	443	332	482	356	340	446	378	363	465	421	428	355	404	372	410	418
25º	442	408	397	445	354	476	357	353	466	400	382	484	450	506	381	450	369	399	441
34º	546	521	409	456	357	476	366	414	457	411	351	490	453	533	407	338	538	398	58.7
41º	645	450	396	449	352	477	354	425	569	418	387	513	459	656	386	-	637	392	70.3
43º	-	510	394	448	366	485	354	432	638	410	375	517	474	726	393	-	674	391	71.7
46º	-	438	384	-	347	474	341	420	71.7	38.7	37	50.5	45.4	76.2	39	-	734	400	74.5
48º	-	429	375	-	342	457	336	421	78.3	40.2	35.7	51.6	44.8	73.4	40	-	792	398	81.6
50º	-	411	382	-	348	477	336	415	84.4	40.9	35.9	50.5	44.3	-	378	-	80	400	84.0
51º	-	416	403	-	365	512	351	416	93.1	44.9	39.5	54.1	48.6	-	406	-	874	416	98.8
53º	-	-	-	-	362	50.1	33.4	-	-	41.4	37.8	51.3	47.5	-	41.4	-	-	38.9	107
60º	-	55.9	48.5	-	36.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tab. 05.** Quadro de acompanhamento dos pesos e da mortalidade durante 60 dias dos camundongos inoculados com  $2 \times 10^6$  células proliferativas do Sarcoma 180 em 0,2ml homogeneizadas durante 1 hora com E.B.L. de *M. velutina* nas respectivas doses: 10, 20 e 30 mg/ml de inóculo. GA, GB e GC, receberam células proliferativas homogeneizadas com extrato vegetal nas doses de 10, 20 ou 30 mg/ml, respectivamente; GD, animais que receberam as células proliferativas não homogeneizadas com extrato vegetal. Marcações individuais: C - cabeça; R - cauda; D - dorso; 2m - duas marcas; S/m - sem marca; - óbito.

	Grupo A					Grupo B					Grupo C					Grupo D				
	C	R	D	2m	S/m	C	R	D	2m	S/m	C	R	D	2m	S/m	C	R	D	2m	S/m
Peso Inicial (g)	sd	54.9	49.8	sd	36.9	37.0	49.8	34.5	sd	sd	42.1	39.4	51.3	47.5	sd	42.6	sd	sd	40.3	50.1
Peso Final (g)	sd	46.9	44.8	sd	36.8	37.0	49.8	34.5	sd	sd	42.1	39.4	51.3	47.5	sd	41.5	sd	sd	40.3	38.7
Volume peritoneal (ml)	sd	8	4	sd	0	0	0	0	sd	sd	0	0	0	0	sd	0.5	sd	sd	0	68

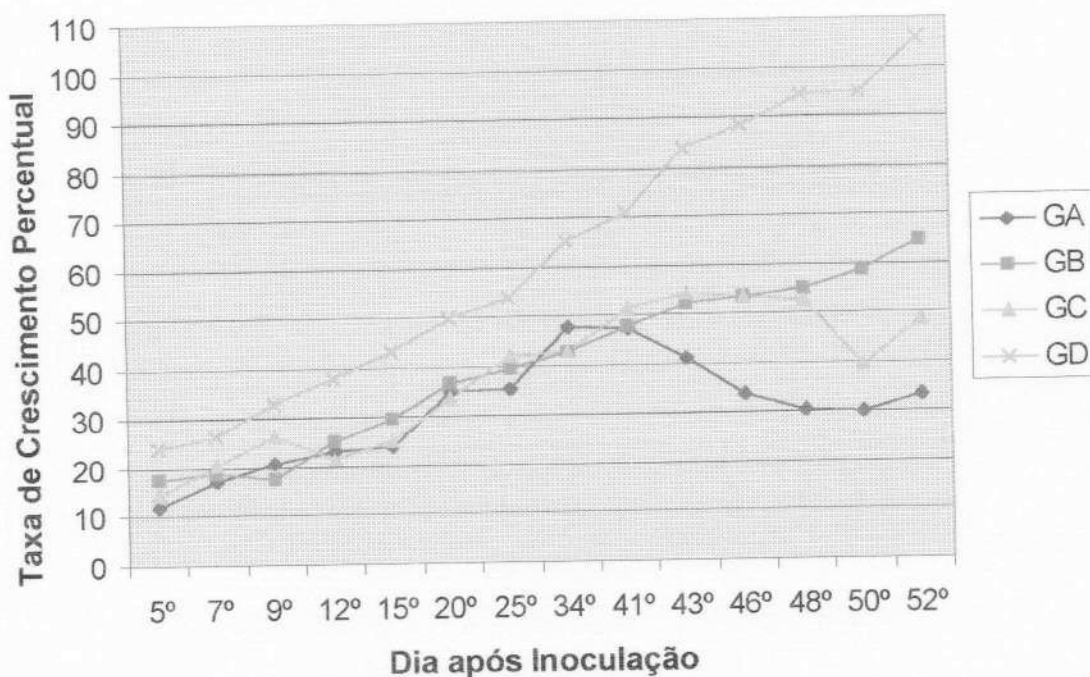
**Tab. 06.** Volume peritoneal obtido após sacrifício de camundongos que sobreviveram até aproximadamente 61

dias após inoculação de células proliferativas de Sarcoma 180.

Marcações individuais: C – cabeça; R – dorso; D – cauda; 2m – duas marcas; S/m – sem marca;

~ óbito; s.d.- sem determinação.





**Fig.07.** Taxa percentual de aumento de peso de camundongos inoculados com  $2 \times 10^6$  células proliferativas do Sarcoma 180 em 0,2 ml homogeneizadas durante 1 hora com extrato bruto liofilizado de *M. velutina* nas seguintes doses: 10, 20 e 30 mg/ml de inóculo. GA, GB e GC, receberam células proliferativas homogeneizadas com extrato vegetal nas doses de 10, 20 ou 30 mg/ml, respectivamente; GD recebeu células proliferativas não homogeneizadas com extrato vegetal.

#### 4.4. Estudo do desenvolvimento de camundongos inoculados com quantidades variáveis de células proliferativas do Sarcoma 180

A partir do seguimento evolutivo dos animais inoculados com doses crescentes de células proliferativas do Sarcoma 180, conforme descrito no item 3.10., pôde-se perceber uma dilatação abdominal assemelhando-os às fêmeas prenhas, e concomitantemente, uma massa muscular atrofiada e vértebras salientes na coluna vertebral, quando comparadas com animais saudáveis. Isto ocorreu independentemente do número de células proliferativas inoculadas, porém, cabe ressaltar que alguns indivíduos dos grupos não desenvolveram ascite, mas perderam peso (0 indivíduo ( $\Delta$ ) no GA, 02  $\Delta$  no GB; 01  $\Delta$  no GC; e 01  $\Delta$  no GD). Além disto, houve também animais que não desenvolveram ascite e não perderam peso considerável, como exemplo, o grupo inoculado com  $5 \times 10^4$  células proliferativas (GA), onde 60% dos animais não desenvolveram ascite até 120 dias após à inoculação (Tab. 07 e 08; Fig.09).

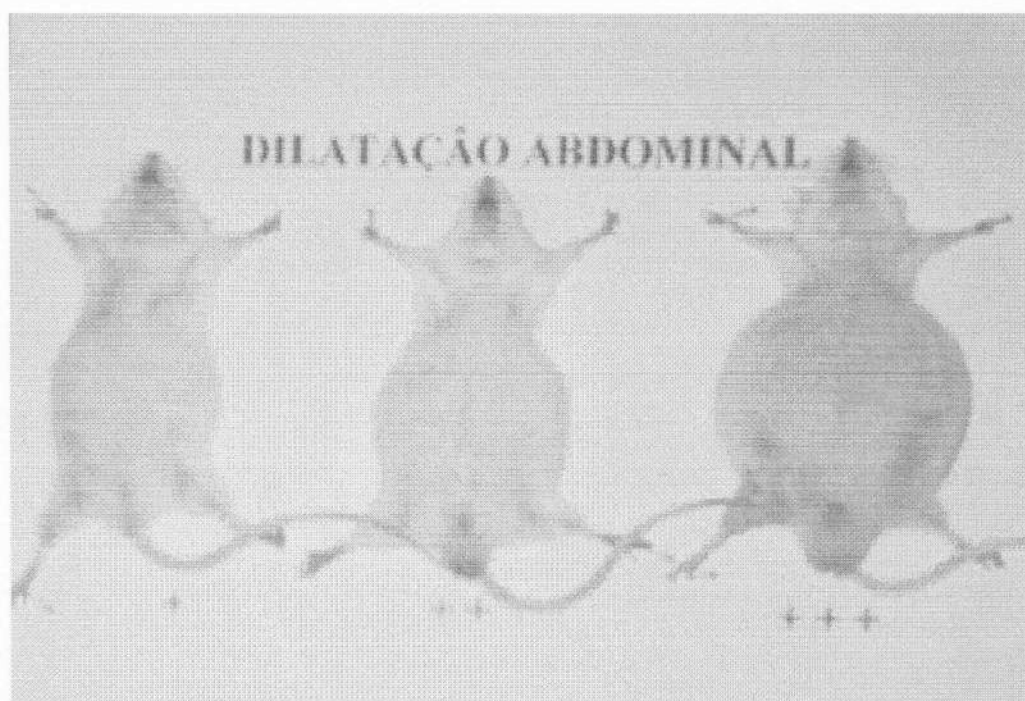
Os níveis de ascite (Fig.08) apresentados pelos animais em cada grupo foram: GA 01  $\Delta$  com o nível ++ e 01  $\Delta$  +++ até o óbito; o GB, 01  $\Delta$  com o nível + e 01  $\Delta$  com +++; o GC, 01  $\Delta$  com o nível ++ e 04  $\Delta$  com +++; e o GD, 01  $\Delta$  com o nível ++, 03  $\Delta$  com +++ (Tab. 07).

Ao analisar o ganho de peso inicial dos animais, até o 19º dia após inoculação, foi possível verificar que não houve diferença significativa entre os grupos ( $p=0,639$ ; Teste ANOVA), ou seja, o acréscimo de peso foi semelhante para todos os grupos (Fig.10). No entanto, os grupos diferiram em relação ao tempo de sobrevivência ( $p=0.00$ ; Teste ANOVA), sendo que o grupo que recebeu  $5 \times 10^4$  células proliferativas (GA) sobreviveu por mais tempo em relação aos outros grupos, GB, GC, GD, grupos inoculados com  $5 \times 10^5$ ,  $2,3 \times 10^6$  e  $1,3 \times 10^7$ , respectivamente (GA/GB -  $p=0,002$ ; GA/GC -  $p=0;000$  GA/GD -  $p=0;000$ ; Teste Tuckey) (Tab. 08; Fig.09).



Grupos	Número de animais que desenvolveram ascite no dia do óbito			Animais que não desenvolveram ascite até o óbito	
	+	++	+++	Perda de peso	Sem perda de peso
GA	0	01	01*	0	03
GB	01*	0	01*	02	01
GC	0	01*	03+01*	0	0
GD	0	01*	02*+01	01	00

**Tab.07.** Acompanhamento do desenvolvimento de ascite ou não em camundongos inoculados com  $5 \times 10^4$  (GA),  $5 \times 10^5$  (GB),  $2,3 \times 10^6$  (GC) e  $1,3 \times 10^7$  (GD) células proliferativas em 0,2 ml de inóculo. Marcações individuais: C – cabeça; R – cauda; D – dorso; 2m – duas marcas; S/m – sem marca; \* - animais com perda de massa muscular aparente.



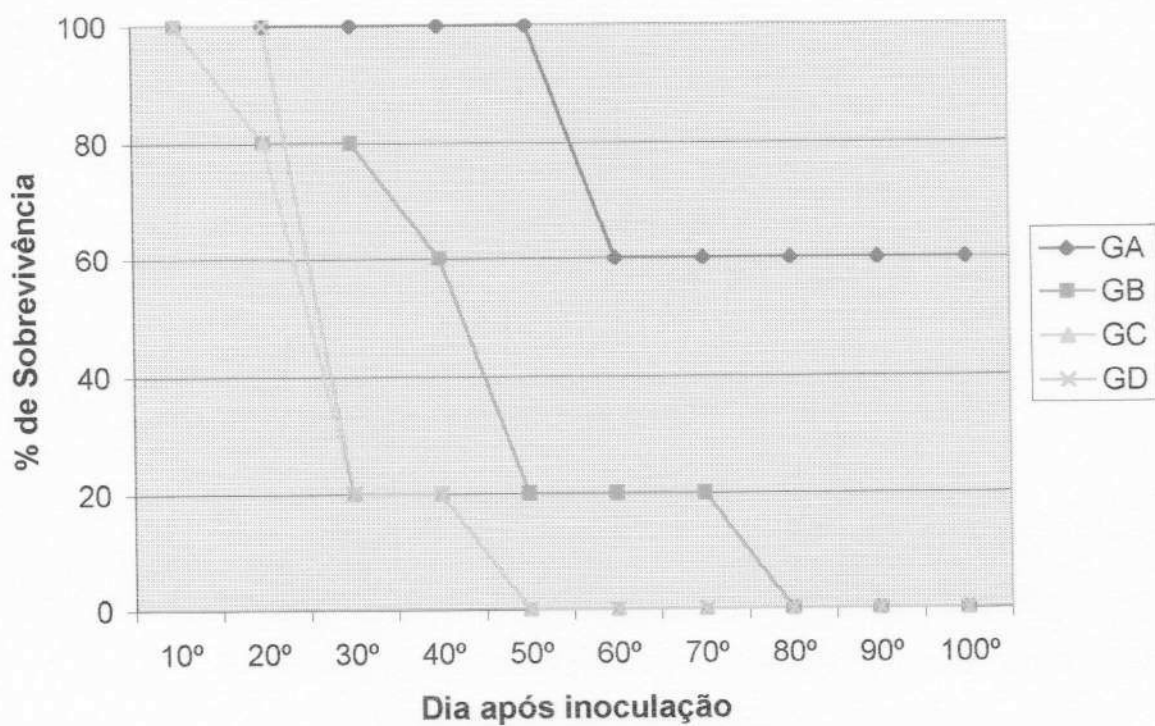
**Fig. 08.** Níveis de ascite desenvolvidos por animais inoculados com células proliferativas do Sarcoma 180: +, menor diâmetro abdominal; ++, diâmetro abdominal intermediário; +++, maior diâmetro abdominal





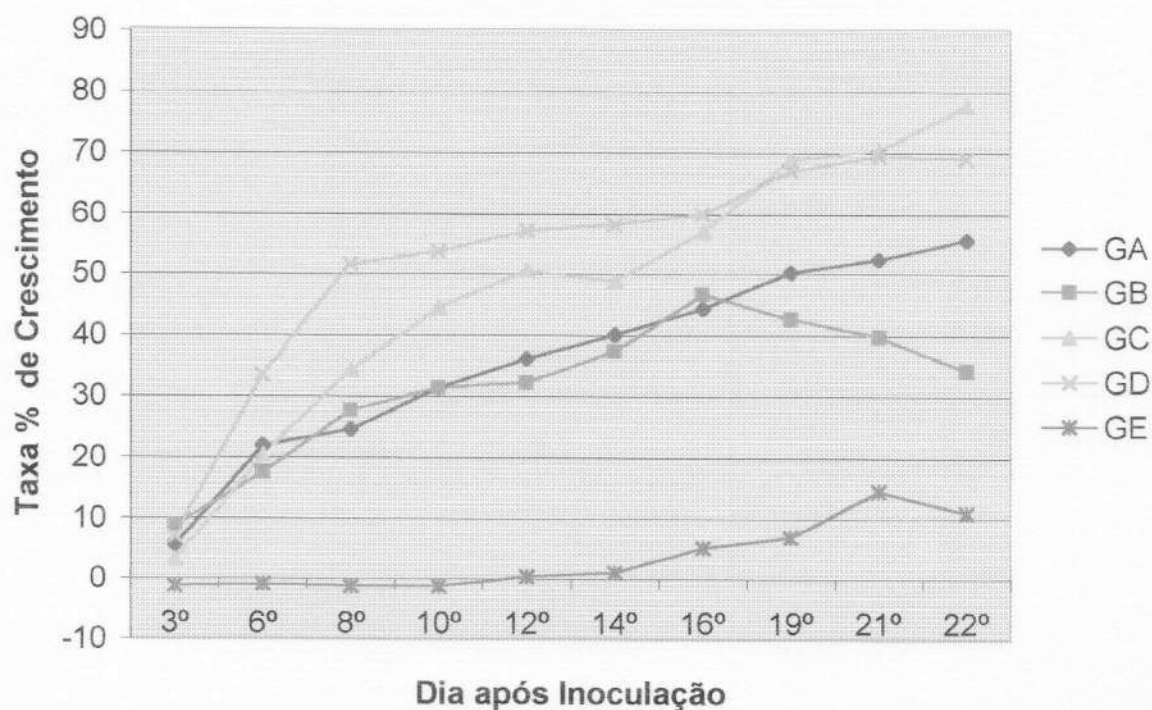
72°	-	41.88	46.19	41.47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77°	-	42.60	45.25	41.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79°	-	41.78	45.70	40.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104°	-	40.06	48.37	36.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tab.08.** Acompanhamento da mortalidade e do peso, durante 104 dias, dos camundongos inoculados com  $5 \times 10^4$ (GA),  $5 \times 10^5$  (GB),  $2,3 \times 10^6$  (GC) e  $1,3 \times 10^7$ (GD) células proliferativas em 0,2 ml de inóculo. s.d. - sem determinação; - óbito; (peso) - peso no dia do óbito; 1, 2 e 3 níveis de ascite desenvolvidos nos camundongos, menor diâmetro abdominal, diâmetro abdominal intermediário, maior diâmetro abdominal, respectivamente; 4 - camundongos com perda de massa muscular; Marcações individuais: C - cabeça; R - cauda; D - dorso; 2m - duas marcas; S/m - sem marca.



**Fig.09.** Taxa de sobrevivência de camundongos inoculados com  $5 \times 10^4$  (GA),  $5 \times 10^5$  (GB),  $2,3 \times 10^6$  (GC) e  $1,3 \times 10^7$  (GD) células proliferativas do Sarcoma 180, acompanhada durante um período de 100 dias após inoculação.





**Fig.10.** Taxa de crescimento percentual de camundongos inoculados com  $5 \times 10^4$  (GA),  $5 \times 10^5$  (GB),  $2,3 \times 10^6$  (GC) e  $1,3 \times 10^7$  (GD) células proliferativas do Sarcoma 180, acompanhada durante um período de 100 dias após inoculação. GE – animais normais (item 4.3; Tab.04).

## V - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O estudo dos possíveis efeitos do extrato bruto liofilizado de *Mandevilla velutina* em *Toxoplasma gondii* e em células proliferativas do Sarcoma 180, teve início a partir do trabalho de SILVA (1996), que administrou este extrato em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* obtendo resultados promissores com relação à redução da parasitemia e da mortalidade. Dessa maneira, poder-se-ia conhecer o espectro de atuação deste extrato vegetal, assim como, o possível mecanismo de ação, ou seja, se este estaria atuando direto e especificamente sobre um determinado parasito ou sobre o sistema imune do hospedeiro.

O extrato foi preparado conforme os procedimentos descritos pelo autor acima citado, os quais foram estabelecidos após uma série de tentativas para se obter uma maior quantidade de princípio(s) ativo(s) e sem proliferação acentuada de microorganismos.

A primeira etapa, deste trabalho, consistiu no estudo da atuação do extrato de *M. velutina* em camundongos inoculados com *T. gondii*.

A princípio não se realizou o processo de quantificação dos taquizoítas, sendo inoculada uma quantidade aleatória, irregular e demasiadamente alta destes, levando os animais ao óbito em torno do 2º e 3º dia, independentemente de terem sido tratados ou não com o extrato vegetal. No entanto, com o objetivo de padronizar o número de parasitos a ser inoculado, o que viabilizaria o tratamento dos animais por um período



prolongado uma vez que, a cepa RH é considerada altamente virulenta, não-cistogênica e patogênica, realizou-se a quantificação, descrita no item 3.5.1. Desse modo, inoculou-se em média  $10^5$  taquizoítas para levar os animais ao óbito em torno do 6º e 7º dia (BLACK, ISRAELSKI & REMINGTON, 1989).

No entanto, ao realizar o ensaio testando as quantidades  $10^5$  e  $2 \times 10^5$  taquizoítas em um número maior de animais, conforme descrito no item 3.7.2.2, constatou-se 50% de mortalidade nos animais normais inoculados com a maior quantidade até o quarto dia após infecção e, a menor quantidade acarretou 70% de mortalidade até o sétimo dia. Este ensaio foi realizado principalmente para observar, nas condições existentes, o tempo de sobrevivência dos animais mediante o número relativo de parasitos inoculados (item 4.1.1.2.; Tab.03a e 03b).

No que se refere a dose do extrato, pôde-se observar que a de 200 mg/kg de animal foi a melhor na via intraperitoneal e a de 400 mg/Kg de animal destacou-se na via orogástrica (itens 4.1.1 e 4.1.2.1.). Isso pôde ter ocorrido pelo fato de que ao se inocular o extrato diretamente no peritônio, este proporcionou uma extensa superfície de absorção com acesso rápido e irrestrito à circulação, havendo, portanto, perda mínima de princípio(s) ativo(s) enquanto que, na administração orogástrica, ocorreu perda deste(s), possivelmente, devido a uma série de fatores que puderam ter interferido na absorção: pH, conteúdo gástrico, motilidade intestinal, solubilidade e concentração do extrato, estabilidade deste no fluido gastrointestinal e ligação à este, e o período que o extrato permaneceu no estômago; sendo este fator, a principal variável que afeta o grau de absorção (RANG, 1991).

No entanto, as doses de 400 e 800 mg/kg de animal apresentaram, dependendo da via de administração, um aumento na porcentagem de mortalidade dos camundongos, inclusive, em alguns casos, sendo superior à porcentagem do grupo controle. Como exemplos: 1 - quando administradas via intraperitoneal, até o quarto dia após infecção, a dose de 400 mg/kg de animal administrada após infecção (GG) proporcionou 100% de mortalidade superando o grupo controle (GI) que apresentou 80% e, a de 800 mg/kg de animal (GH) comportou-se semelhante ao controle (Tab.01; Fig.01); 2 - quando administradas via orogástrica, até o sexto dia após infecção, a dose de 400 mg/kg de animal administrada durante três dias antes da infecção (GC) resultou em 80% de mortalidade semelhante aos grupos que receberam as doses de 100 e 200 mg/kg de animal (GA e GB, respectivamente) e, a de 800 mg/kg de animal, tanto no pré-tratamento como tratamento (GD e GH,



respectivamente), ocasionou 100%, sendo análoga à porcentagem do grupo controle (GI); exceção feita ao tratamento após infecção com 400 mg/kg de animal (GG) administrada via orogástrica, por ter apresentado uma taxa de 40% (Tab.02; Fig.03).

Não se atribuiu a interferência de efeitos colaterais das doses utilizadas pois estudos anteriores realizados por SILVA (1996) mostraram que as doses de 71,5 a 2145,0 mg/kg de animal, não apresentaram efeitos colaterais administradas via orogástrica em camundongos normais, não infectados (SILVA, 1996). Cabe frisar que, não são conhecidos efeitos fisiológico de doses superiores à 200 mg/kg de animal em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Os possíveis mecanismos pelos quais o extrato de *Mandevilla velutina* atua nos camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*, não foram estudados neste trabalho. No entanto, sugere-se que seja idêntico ao mecanismo provavelmente envolvido na infecção experimental com camundongos inoculados com *T. cruzi*, o Sistema Óxido Nítrico, por se tratar do mesmo extrato vegetal (SILVA, 1999).

O Sistema Óxido Nítrico constitui um dos vários mecanismos de defesa do sistema imune frente à invasão de microrganismos e, consiste na produção de óxido nítrico (NO), mediante ativação de macrófagos inflamatórios que desencadeiam a conversão da L-arginina em L-citrulina pela ação da óxido nítrico sintetase induzível (NOS) na presença de NADPH e Tetraidrobiopterina (ROOK, 1997). O NO formado promove a formação de outros radicais livres, como peróxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), o qual é transformado em íon hidroxílico (OH<sup>-</sup>) e dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), sendo altamente tóxicos para os microrganismos invasores (HÖLSCHER *et al.*, 1998 *apud* SILVA, 1999).

Além disso, segundo CANDOLFI e cols. (1996) o Sistema de Óxido Nítrico parece atuar sobre o mecanismo de destruição do *Toxoplasma gondii*, pois ao testar aminoguanidina, inibidor da produção de NO, houve aumento na taxa de mortalidade de camundongos infectados com a cepa C56 tratados com sulfadiazina, um quimioterápico contra infecção ocasionada por *T. gondii*.

Neste trabalho, o único animal sobrevivente entre o grupo de animais tratados após infecção com a dose de 400 mg/kg de animal (GG), via orogástrica, justificou-se, talvez, pela variação biológica, ou seja, o animal

em questão poderia ser geneticamente mais resistente do que os outros (Tab. 02).

Em relação aos ensaios terapêuticos que utilizaram células proliferativas do Sarcoma 180, estes foram realizados por meio da homogeneização do extrato nas doses de 10, 20 e 30 mg/ml de inóculo, durante uma hora, com as células proliferativas, para depois, serem inoculadas em camundongos normais, conforme descrito no item 3.9.

Sugere-se que o extrato tenha atuado reduzindo a taxa de divisão e crescimento das células proliferativas, ou até mesmo, lesando-as. Os grupos inoculados com as células possivelmente alteradas ou/em menor número por estarem homogeneizadas com 20mg/ml (GB) e 30 mg/ml (GC), apresentaram uma taxa de crescimento médio de 60% quando comparado com o grupo controle, em torno de 110% (Fig.07). Além do mais, nos animais remanescentes destes grupos, sacrificados 61 dias após inoculação, constatou-se o não desenvolvimento de ascite visível e/ou perda de massa muscular, sugerindo que, o ganho de peso referia-se ao desenvolvimento normal dos camundongos (Tab. 05).

O ensaio, conforme descrito no item 3.10., utilizando doses crescentes de células proliferativas do Sarcoma 180 foi realizado para se obter mais informações a respeito deste sarcoma.

Nos animais inoculados com as doses superiores, GC e GD, não se observou o desenvolvimento de ascite +, talvez, seja pelo fato de não ser detectado a olho nú ou o observador não possuir tal acuidade visual, ou, ainda, pelo fato destes animais apresentarem uma evolução súbita do quadro de ascite, em conseqüência da alta quantidade de células proliferativas (Tab. 08). As doses inoculadas nestes grupos, proporcionaram um tempo de sobrevivência semelhante a ambos, o qual é ideal no que se refere ao tempo reduzido para se acompanhar animais em ensaios terapêuticos.

Constatou-se também que, pelo fato da taxa percentual de sobrevivência dos animais inoculados com a menor quantidade (GA) ter sido em torno de 60%, até 150° dia (Fig.09), a quantidade de  $5 \times 10^4$  células proliferativas não seria a ideal, pois não possibilitaria a verificação da eficácia terapêutica. Neste caso, atribuiu-se possíveis fatores relacionados: a quantidade não é suficiente para ocasionar o desenvolvimento das manifestações polimórficas do sarcoma, talvez, pelo fato do organismo combatê-lo; os animais até este período, ainda, não as desenvolveram, podendo adquiri-las tardiamente.



Segundo LUBINEICKI & CYPRESS (1975) *apud* PEREIRA e cols. (1983), o tempo de sobrevivência e o período de incubação (período decorrido desde a inoculação até o aparecimento da ascite) são proporcionais à quantidade de células proliferativas inoculadas em camundongos, isto foi constatado no presente trabalho (Tab.08). Além disso, a taxa relativa de aumento do peso dos grupos foram independentes da quantidade inoculada, permanecendo constante entre os grupos, por não haver diferença significativa entre GA, GB, GC e GD, ao contrário da duração da doença (período compreendido entre o início da formação da ascite até a morte).

Também, comparou-se o desenvolvimento do peso dos animais inoculados com células proliferativas com o de animais normais, ou seja, não inoculados com células proliferativas, apresentando estes uma taxa de crescimento aproximadamente constante e inferior à aqueles (Tab.04; Fig.10). Cabe ressaltar que os animais utilizados são adultos e, portanto, não apresentam uma taxa de crescimento significativamente ascendente.

Sendo assim, acredita-se que ocorra um aumento inicial no peso dos animais, decorrente da multiplicação das células do Sarcoma 180 e, em paralelo, uma súbita e progressiva perda de massa muscular. Isto possivelmente, ocorria devido a um grande crescimento inicial do número de células proliferativas, debilitando o hospedeiro, o qual teve sua resistência orgânica reduzida, devido ao provável catabolismo músculo-protéico e as sérias alterações bioquímicas.

Os ensaios experimentais realizados com Sarcoma 180 não possibilitaram obter considerações a respeito da atuação do extrato de *M. velutina* pois, as células proliferativas ocasionaram manifestações polimórficas que dificultaram o estudo, o qual foi encerrado por ir contra as Normas Éticas Internacionais por causar desconforto e angústia aos animais.

Pôde se concluir que o extrato bruto liofilizado de *Mandevilla velutina* não atua de maneira significativa no aumentando do tempo médio de sobrevivência de camundongos infectados por *Toxoplasma gondii*, assim como, em células proliferativas do Sarcoma 180, matando-as diretamente ou reduzindo a taxa de multiplicação e crescimento.

De maneira ampla, atribui-se a interferência de vários fatores: variações da resposta imunológica, por não se utilizar camundongos isogênicos SPF (livre de patógenos específicos), tanto pelo alto custo, como para manutenção; pela ausência de monitoramento da temperatura; pelo uso



de uma cepa altamente virulenta de *T. gondii*, e pelo fato do pouco conhecimento da fisiopatologia do Sarcoma 180, o que impossibilitou a montagem de protocolos mais aperfeiçoados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEZZATO, B. **Desenvolvimento anatômico e propagação vegetativa de *Mandevilla velutina* variedade gabra (Muell-Arg) WOODSON-APOCINACEAE.** São Paulo, 1998. 100p. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1988.
- ARAÚJO, E. S. **Efeito do veneno de *Apis mellifera* sobre o Sarcoma TG180.** Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Centro de Ciências Biomédicas, 1995. 48p. Monografia, Graduação.
- BLACK, C. M., ISRAELSKI, D. M., SUZUKI, Y., REMINGTON, J. S. Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* ou *Trypanosoma cruzi*. **Immunology**, n.68, p.570-574, 1989.
- BOGLIOLO, L., LIMA PEREIRA, F. E., GUIMARÃES CARDOSO, R. Transtornos do crescimento e da diferenciação celular. In: BOGLIOLO, L. **Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981. 1236p. p.180-205.

- CALIXTO, J. B., YUNES, R. A., BELLA CRUZ, A., MEDEIROS, Y. S. Effect of compounds from *Mandevilla velutina* on bradykinin-mediated contractile and relaxant responses of the isolated guineal pig trachea. **Agents Actions**, v.36, p.223-229, 1992.
- CALIXTO, J. B., ZANINI, J. C., CRUZ, A. B., YUNES, R. A., MEDEIROS, Y. S. Extract and compounds obtained from *Mandevilla velutina* inhibit Arachidonic Acid-induced ear oedema in mice, but not rat stomach contraction. **Prostaglandins**, v.41, n.5, p.515-526, 1991.
- CAMARGO, M. C. V., ANTUNES, C. M. F., CHIARI, C. A. Epidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* no município de Ribeirão das Neves, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.28, n.3, p.211-214, 1995.
- CANDOLFI, E., VILLARD, M., THOUVENIN, & KEIN, T. T. Role of nitric oxide-induced immune suppression in toxoplasmosis during pregnancy and in infection by a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. In: GROSS, U. **Current topics in microbiology and immunology**. Berlin: Springer, 1996. 274p. p.141-151.
- COUTINHO, S. G. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: REY, L. **Parasitologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 731p. p.274-286
- FONSECA, J.S., MARTINS, G. A. **Curso de estatística**. 3 ed. São Paulo: Atlas, 1982. 147p.
- GROSS, U. **Current topics in microbiology and immunology**. Berlin: Springer, 1996. 274p.



- by the extract from *Mandevilla velutina*. **Agents and Actions**, v.33, n.34, p.273-277, 1991.
- KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1995. 524p. p.174-187.
- MING, L. C. Estudo e pesquisa de plantas medicinais na Agronomia. **Horticultura Brasileira**, v.12, n.1, p.3-8, 1994.
- NETO, V. A., CAMPOS, R., BARZZI, R. G., DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. São Paulo: Sarvier, 1982. 156p.
- NEVES, P. C. A., NEVES, M. C. A., CRUZ, A. B., SANT'ANA, A. E. G., YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. Differential effects of *Mandevilla velutina* compounds on paw oedema induced by phospholipase A2 and phospholipase C. **European Journal Farmacology**, v.243, p.213-219, 1993.
- NÓBREGA, P. A toxoplasmose nos animais. In: NETO, V. A., CAMPOS, R., BARZZI, R. G., DUARTE, M. I. S. **Toxoplasmose**. São Paulo: Sarvier, 1982. 156p. p.25-34.
- PEREIRA, F. E. L., RASO, R., COELHO, P. M. Z. Evolution of Sarcoma 180 (ascitic tumor) in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.19, n.1, p.39-42, 1986.
- PEREIRA, F. E. L., SASSINE, W. A., BOUHABIB, D. C. LUCAS, E. A. Evolution of Sarcoma 180 in mice infected with *Trypanossoma cruzi*. **Membro do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.78, n.3, p.237-244, 1983.
- RANG, H. P. **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

- ROOK, G. Imunidade às bactérias e aos fungos. In: ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1998.
- SILVA, R. M. G. **Efeito do Extrato de *Mandevilla velutina* (Apocinaceae) na infecção de camundongos por *Trypanosoma cruzi***. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Centro de Ciências Biomédicas, 1996. 56p. Monografia, graduação.
- SILVA, R. M. G. **Estudo da ação tripanomicida do extrato bruto de *Mandevilla velutina* em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi***, 1999. 60p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia, Centro de Ciências Biomédicas, 1999.
- WILSON, C. B., TSAI, V., REMINGTON, J. S. Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages: possible mechanism for survival of intracellular pathogens. **Journal experimental medical**. v.151, p.328.